

На правах рукописи



ГАЛУХИН АНДРЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ НИЖНЕГО ОБОДА
II-ТРЕТ-БУТИЛТИАКАЛИКС[4]АРЕНА АЗОТСОДЕРЖАЩИМИ ФРАГМЕНТАМИ:
СИНТЕЗ РЕЦЕПТОРОВ И ИХ КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПО
ОТНОШЕНИЮ К НЕКОТОРЫМ АНИОНАМ И ПОЛИАНИОНАМ**

02.00.03 - Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре органической химии Химического института им. А.М.Бутлерова федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор

Стойков Иван Иванович

Официальные оппоненты:

Гаврилова Елена Леонидовна,

доктор химических наук, профессор кафедры органической химии ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

Газизов Альмир Сабинович,

кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории элементоорганического синтеза ФГБУН «Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова» РАН, г.Казань

Ведущая организация:

Научно-исследовательский институт физической и органической химии ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет» (НИИ ФОХ ЮФУ), г.Ростов-на-Дону

Защита диссертации состоится «14» ноября 2013 года в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 212.081.30 по химическим наукам при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета. Автореферат размещен на сайте www.krpu.ru. Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, 18, ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», научная часть.

Автореферат разослан «27» сентября 2013 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.081.30

кандидат химических наук, доцент

М.А. Казымова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Современной тенденцией развития органической химии является постепенное усложнение синтезируемых объектов, а также выявление качественных и количественных закономерностей, связывающих структуру соединения с проявляемыми им свойствами. В области молекулярного дизайна супрамолекулярных рецепторов, являющейся одним из наиболее динамично развивающихся направлений современной органической химии, также наблюдается тенденция перехода от изучения связывания «простых» низкомолекулярных субстратов к распознаванию биологических макромолекул.

Постепенное усложнение структуры синтетических рецепторов немислимо без использования макроциклических соединений, играющих роль молекулярных платформ, задающих ориентацию центров связывания и определяющих селективность и эффективность взаимодействия пары «рецептор-субстрат». Одними из наиболее широко используемых молекулярных платформ являются каликсарены и тиакаликсарены, обладающие набором привлекательных свойств (возможностью функционализации верхнего и нижнего ободов макроцикла, конформационным разнообразием, синтетической доступностью). В связи с этим вызывает большой интерес разработка методик синтеза производных тиакаликс[4]аренов, отличающихся числом и пространственным расположением участков связывания, а также способных к распознаванию различных анионных и полианионных субстратов.

Несмотря на успехи исследователей в создании систем, способных к селективному связыванию и массопереносу анионных субстратов, задача распознавания поверхности полианионов (нуклеиновых кислот) до сих пор не решена. Одним из возможных её решений является применение супрамолекулярных коллоидных экзорепторов.

Разработка принципов нековалентной самосборки производных каликсаренов с формированием монодисперсных коллоидных частиц, способных к распознаванию целевых субстратов своей поверхностью, является комплексной задачей, требующей глубокого понимания закономерностей протекающих процессов. Подобные ассоциаты показали свою эффективность в процессах массопереноса различных лекарственных препаратов через фосфолипидные мембраны.

Степень разработанности темы исследования. Большинство ранее проведенных исследований в рамках обозначенной темы было направлено на разработку эффективных и селективных рецепторов на анионные субстраты, а также на выявление закономерностей типа «структура-свойство», позволяющих целенаправленно получать соединения, обладающие заданными комплексообразующими характеристиками. Однако полученные закономерности удовлетворительно работают только для простейших сферических анионных субстратов. Современные исследования в данной области имеют тенденцию перехода от изучения селективного связывания сферических анионов к распознаванию сложных биологических полианионов с целью их транспорта через различные мембраны,

каталитических превращений, выявления их антимикробной и антибактериальной активности.

Как показали исследования, постепенное усложнение структуры синтетических рецепторов немыслимо без использования макроциклических соединений, играющих роль молекулярных платформ, задающих ориентацию центров связывания и определяющих селективность и эффективность взаимодействия пары «рецептор-субстрат». Наибольший интерес исследователей привлекает введение гуанидиниевых фрагментов, комплементарных фосфатным и карбоксилатным группам, позволяющих осуществлять распознавание субстрата в широком интервале рН. На сегодняшний день наиболее широко используемой молекулярной платформой является каликсарен, в то время как его тиа-аналог, тиакаликсарен, обладающий большим конформационным разнообразием и синтетическим потенциалом, исследован в гораздо меньшей степени.

Целью работы является синтез замещенных по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликсаренов, функционализированных азотсодержащими группами (фталимидные, аминные, мочевиные, аммонийные, гуанидиниевые) для распознавания анионных и полианионных субстратов, установление их структуры комплексом физических методов, оценка комплексообразующей способности полученных соединений по отношению к некоторым однозарядным анионам и модельным олиго- и полинуклеотидам.

В задачи работы входят:

- Синтез производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, содержащих фталимидные, аминные, мочевиные, аммонийные, гуанидиниевые фрагменты на нижнем ободу макроцикла.
- Установление структуры полученных соединений комплексом физических методов.
- Установление агрегационных характеристик полученных водорастворимых производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена.
- Количественная оценка комплексообразующей способности полученных соединений по отношению к некоторым однозарядным анионам
- Оценка комплексообразующей способности полученных соединений по отношению к модельным олиго- и полинуклеотидам.
- Анализ влияния структуры полученных макроциклов на их комплексообразующую способность по отношению к некоторым однозарядным анионам, а также модельным олиго- и полинуклеотидам.

Научная новизна работы состоит в следующем:

- впервые синтезированы частично- и тетразамещенные по нижнему ободу производные *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена в конфигурациях *конус* и *1,3-альтернат*, содержащие фталимидные, аминные, фенилмочевиные, аммонийные, гуанидиниевые фрагменты. Структура соединений установлена комплексом физических методов;
- установлена стереоселективность реакции *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена и *N*-(3-бромпропил)фталимида в ацетонитриле, контролируемая природой «темплатного» катиона соответствующего карбоната щелочного металла: в случае карбоната натрия образуется

тетразамещенное производное в конформации *конус*, а в случае карбонатов калия и цезия – *1,3-альтернат*;

- установлено влияние макроциклической платформы *n-трет*-бутилтиакаликс[4]арена на реакционную способность amino- и *N,N'*-ди-(*трет*-бутоксикарбонил)гуанидиниевых групп;

- впервые получены липидные наночастицы на основе производного тиакаликс[4]арена, содержащие гуанидиниевые группы на поверхности. Методами электронной и флуоресцентной спектроскопии показано эффективное взаимодействие полученных наночастиц с модельным полинуклеотидом, приводящее к денатурации последнего.

Теоретическая и практическая значимость. Синтезированы 24 новых частично- и тетразамещенных по нижнему ободу *n-трет*-бутилтиакаликс[4]арена в конформациях *конус* и *1,3-альтернат*, содержащих фталимидные, аминные, фенилмочевинные, аммонийные, гуанидиниевые фрагменты. Структура соединений установлена комплексом физических методов. Методами электронной и флуоресцентной спектроскопии показаны эффективные комплексообразующие свойства полученных макроциклов по отношению к однозарядным анионам и многозарядным олиго- и полинуклеотидам, что открывает новые возможности для создания трансфекционных агентов, а также антибактериальных и противомикробных препаратов. Установленные синтетические, физико-химические и структурные характеристики, а также результаты их интерпретации вносят весомый вклад в развитие экспериментальных и теоретических взглядов на создание рецепторов на анионные субстраты.

Методология и методы исследования. В рамках проведенных исследований был использован широкий набор методов, включая последние методологические разработки в области синтеза макроциклических соединений, современные методы анализа состава смесей веществ и выделения из них индивидуальных соединений (тонкослойная и препаративная хроматография), методы изучения пространственного строения и физико-химических характеристик полученных соединений (одномерная и двумерная ЯМР ^1H , ^{13}C , ИК, флуоресцентная - спектроскопия, масс-спектрометрия (MALDI TOF)).

Личный вклад автора заключается в разработке методов направленного синтеза новых азотсодержащих производных *n-трет*-бутилтиакаликс[4]арена; идентификации новых полученных соединений и установлении их структуры; исследовании комплексообразующих характеристик синтезированных соединений; обобщении и анализе полученных результатов и литературных данных. Большая часть экспериментальных результатов и выводов сделаны автором лично.

На защиту выносятся:

Синтез ряда новых производных *n-трет*-бутилтиакаликс[4]арена, содержащих фталимидные, аминные, фенилмочевинные, аммонийные и гуанидиниевые группы. Разработка методов синтеза тетра- и частично замещенных по нижнему ободу производных *n-трет*-бутилтиакаликс[4]арена, содержащих гуанидиниевые группы.

Закономерности, связывающие структурные факторы замещенных по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов с их комплексообразующей способностью по отношению к некоторым однозарядным анионам, а также модельным олиго- и полинуклеотидам.

Получение липидных наночастиц на основе производных тиакаликс[4]арена, содержащих гуанидиниевые группы на поверхности, а также их эффективное взаимодействие с модельным полинуклеотидом.

Степень достоверности результатов. Высокая степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается тем, что в ходе выполнения диссертационной работы использован целый ряд различных современных физико-химических методов анализа.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на Итоговой научной конференции Казанского федерального университета (Казань, 2011), XIX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Волгоград, 2011), Международном конгрессе по органической химии (Казань, 2011), X Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета “Материалы и технологии XXI века” (Казань, 2011), Всероссийской конференции «Органический синтез: химия и технология» (Екатеринбург, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи и 11 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 128 страницах машинописного текста, включает 40 рисунков и 7 таблиц. Состоит из введения, трех глав, выводов и списка использованных библиографических источников, включающего 115 ссылок.

В первой главе представлен обзор литературных данных, посвященных рецепторам на основе макроциклических молекулярных платформ, применение которых позволило совершить настоящий прорыв в распознавании анионных субстратов. Отдельные главы посвящены распознаванию полианионных субстратов и сопряженным с распознаванием процессам массопереноса и катализа.

Основные результаты экспериментальных исследований и их обсуждение приведены во второй главе. Обсуждены различные синтетические подходы к получению производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, содержащих аминные, аммонийные, мочевиные и гуанидиниевые фрагменты, исследованы комплексообразующие свойства полученных соединений по отношению к однозарядным анионам, а также ряду модельных олиго- и полинуклеотидов. Методами флуоресцентной спектроскопии показано эффективное взаимодействие полученных рецепторов с изученными анионными и полианионными субстратами.

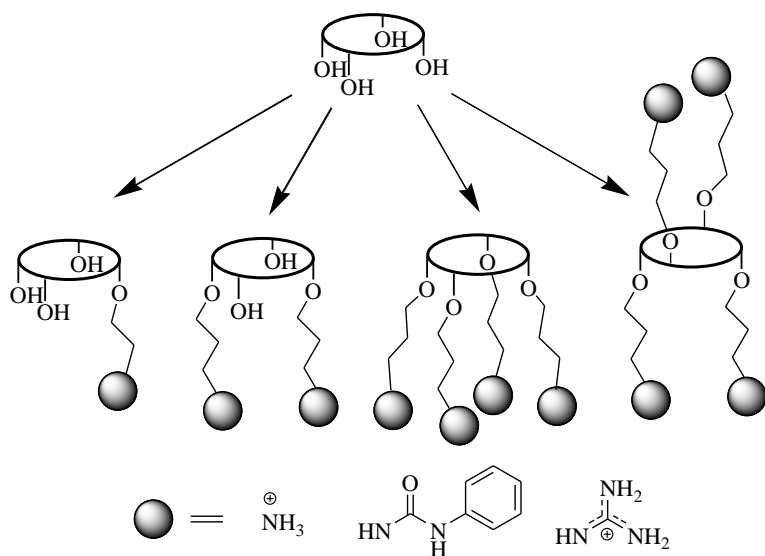
Экспериментальная часть работы, включающая описание проведенных синтетических, спектральных экспериментов, а также экспериментов по изучению агрегации, приведена в третьей главе диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Синтез функционализированных по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов с азотсодержащими протонодонорными фрагментами

При конструировании супрамолекулярных рецепторов на анионные субстраты значительные успехи достигнуты при использовании в качестве участков связывания мочевиновых, аммонийных и гуанидиниевых групп. Каждый из фрагментов имеет свои преимущества и недостатки: мочевиновые группы благодаря отсутствию заряда применяются для распознавания анионных субстратов в органических средах, но не эффективны в водных, аммонийные группы отличаются легкостью получения, возможностью использования в водных средах, однако в узком интервале pH, а гуанидиниевые могут использоваться для распознавания анионных субстратов в воде в широком интервале pH.

Создание синтетических рецепторов с использованием макроциклических молекулярных платформ, таких как каликсарены и тиакаликсарены, способных пространственно предорганизовывать центры связывания рецептора (рис.1), позволяет осуществлять дитопное распознавание ионных пар и цвиттер-ионов, распознавание субстратов сложной формы и их каталитические превращения, создавать молекулярные контейнеры путем нековалентной самосборки. В связи с этим значительный интерес вызывает применение тиакаликс[4]ареновой платформы для конструирования рецепторных структур на анионные и полианионные субстраты путем введения различных азотсодержащих фрагментов по нижнему ободу макроцикла. Для этого последовательно



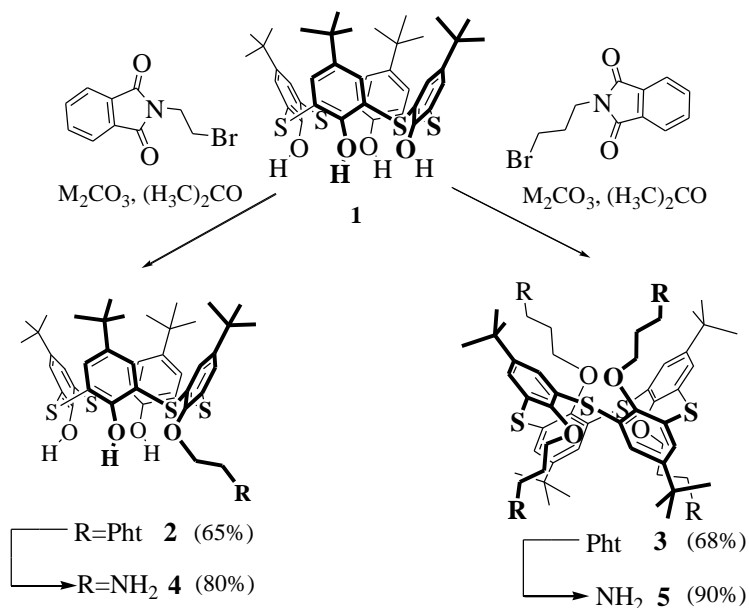
решались задачи регио- и стереоселективного введения первичных аминогрупп по нижнему ободу макроцикла, дальнейшая их трансформация в целевые фрагменты, а также изучение комплексообразующих характеристик полученных рецепторов.

Известно, что при алкилировании *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена в ацетоне в присутствии

Рис.1. Пространственное расположение участков связывания в различных производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена.

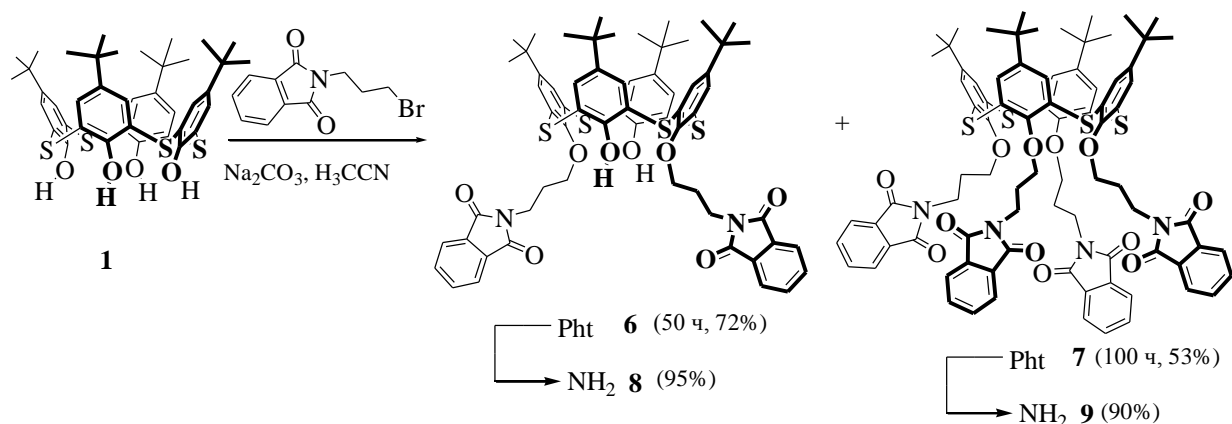
карбонатов цезия или калия варьирование длины мостика, соединяющего фталимидный фрагмент и уходящую группу в бромалкилфталимидах, позволяет получать производные тиакаликс[4]арена, в которых число алкилфталимидных групп варьируется от одной до четырех. Оказалось, что темплатный эффект катиона металла при взаимодействии *N*-(3-

бромпропил)фталимида с *n*-трет-бутилтиакаликс[4]ареном в ацетоне не проявляется, и единственным продуктом реакции является тетразамещенный продукт **3**, находящийся в конфигурации *1,3-альтернат*.



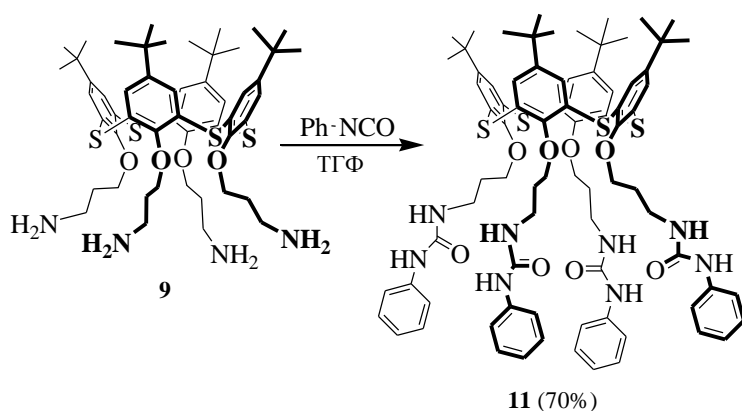
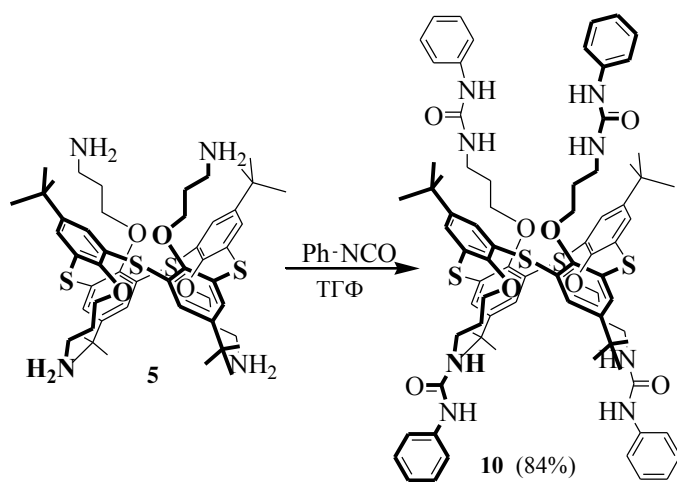
С целью получения продукта в конформации *конус* при проведении реакции в качестве растворителя нами был предложен ацетонитрил, обладающий более высокой температурой кипения и более слабыми протоноакцепторными и сольватирующими свойствами по сравнению с ранее использованным ацетоном, что делает его перспективным для реализации темплатного эффекта катиона металла. В присутствии карбоната

натрия образуется целевой продукт **7**. Оказалось, что в зависимости от времени проведения реакции можно выделить 1,3-дизамещенное производное **6** (50 ч, 72 %) и тетразамещенное производное **7** (100 ч, 53 %) в конфигурации *конус*.



Взаимодействием всех синтезированных фталимидсодержащих производных **2, 3, 6, 7** с гидразингидратом в смеси этанол-ТГФ были получены соответствующие амины **4, 5, 8, 9**. Следует отметить, что количество фталимидных групп в макроциклах **2, 3, 6, 7** не влияет на время протекания реакции. Целевые соединения были получены с высокими выходами (80-95 %).

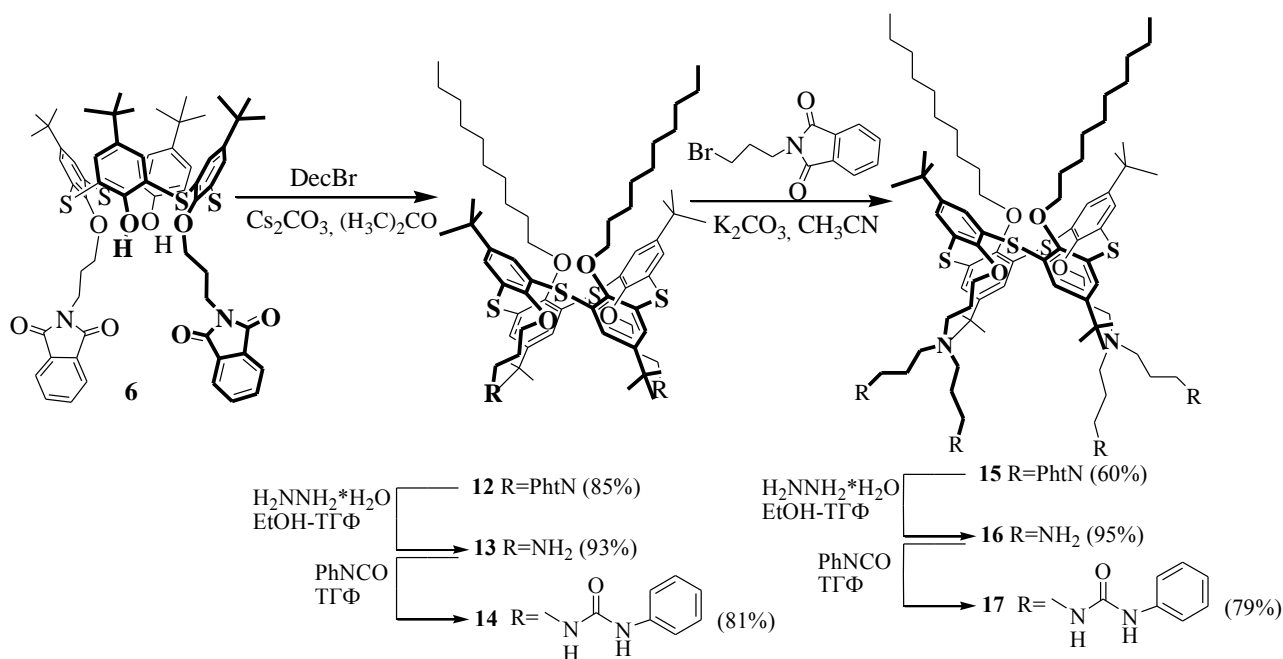
Для введения протонодонорных мочевиных фрагментов было изучено взаимодействие аминов **5** и **9** с фенилизоцианатом в тетрагидрофуране. В результате с высокими выходами были получены соответствующие производные **10** (*1,3-альтернат*) и **11** (*конус*), отличающиеся конфигурацией макроциклической платформы.



С целью введения гидрофобных фрагментов в структуру тиакаликс[4]арена, наличие которых, наряду с полярными группами, позволяет получать различные коллоидные системы, было изучено взаимодействие макроцикла **6** с 1-бромдеканом в ацетоне в присутствии карбоната цезия. Было выделено тетразамещенное производное тиакаликс[4]арена **12** в конфигурации *1,3-альтернат*, которое было превращено в соответствующий амин **13** и далее в целевой макроцикл **14**.

С целью повышения числа связывающих фрагментов было изучено взаимодействие амина **13** с *N*-(3-бромпропил)фталимидом в

ацетонитриле в присутствии карбоната калия. Полученный продукт *N*-алкилирования **15** гидразинолизом в смеси этанол-ТГФ был превращен в амин **16** и далее в целевое соединение **17** действием фенилизотиоцианата в тетрагидрофуране.

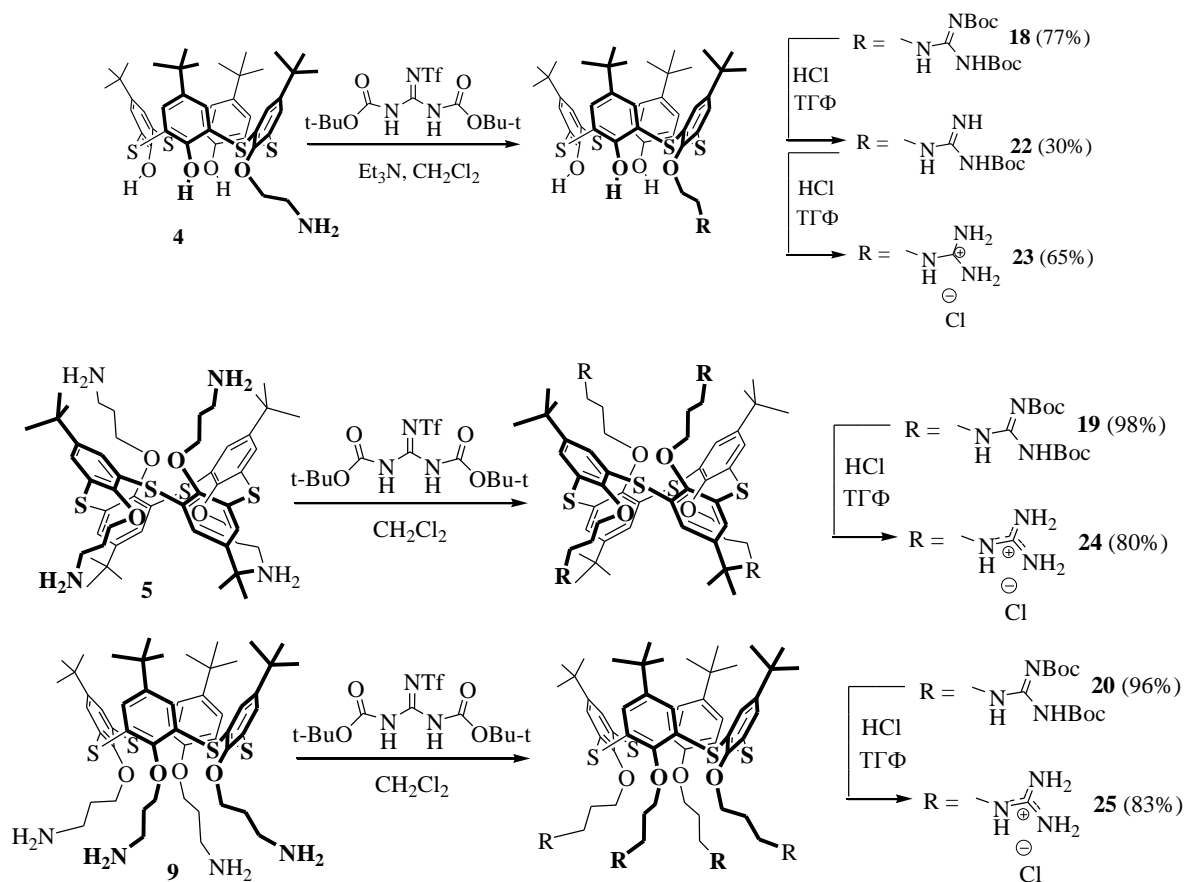


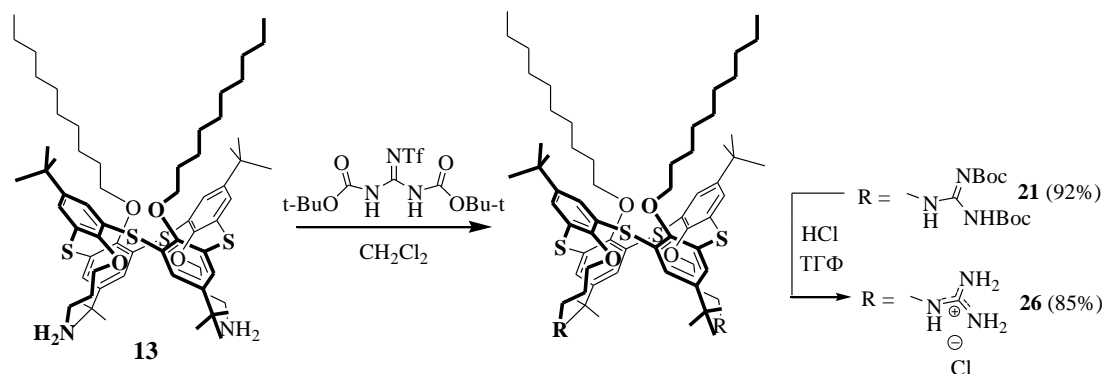
С целью получения гуанидинийсодержащих производных *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена было изучено взаимодействие синтезированных аминов **4**, **5**, **8**, **9**, **13**

с рядом гуанидирующих реагентов, отличающихся реакционной способностью, синтетической и коммерческой доступностью.

Оказалось, что такие классические реагенты, как 3,5-диметил-1Н-пиразол-1-карбоксамидин нитрат, цианамид и соли изотиоурония, успешно применяющиеся для введения гуанидиниевых фрагментов в немакроциклические производные, независимо от условий реакции, являются неэффективными в случае производных тиакаликс[4]арена **4**, **5**, **8**, **9**, **13**: во всех случаях образуются трудно разделяемые смеси продуктов частичной функционализации.

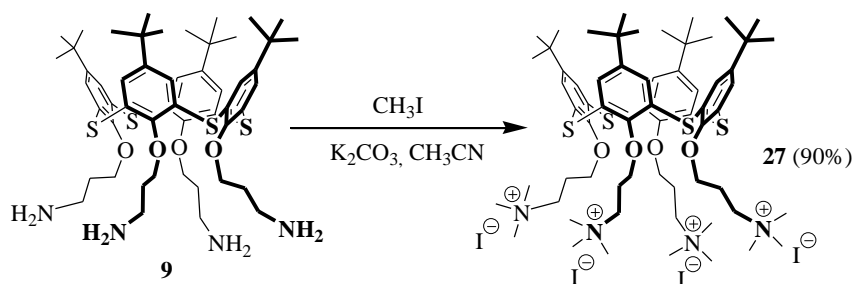
Поскольку во всех случаях целевые соединения получены не были, решено было использовать дизащенные трифлилгуанидины, которые являются одними из самых эффективных гуанидирующих реагентов. Наш выбор остановился на *N,N'*-ди-(*трет*-бутоксикарбонил)-*N''*-трифлилгуанидине. Синтез проводился в два этапа: сначала соответствующие амины вводились в реакцию с *N,N'*-ди-(*трет*-бутоксикарбонил)-*N''*-трифлилгуанидином, далее полученное производное обрабатывалось сильной кислотой для удаления *трет*-бутоксикарбонильных защитных групп. Метод удобен тем, что стадия снятия *трет*-бутоксикарбонильной защиты может протекать под действием различных кислот, что дает возможность варьировать противоион гуанидиниевой группы в достаточно широких пределах.





В результате с высокими выходами были получены соответствующие Вос-защищенные гуанидиниевые производные **18-21**. Следует отметить, что условия и время реакции отличались для разных исходных аминов **4**, **5**, **8**, **9**, **13**: превращение аминов на основе тетразамещенных производных тиакаликс[4]арена **5**, **9**, **13** протекало быстро и не требовало катализаторов, в случае соединения **4** со свободными фенольными гидроксилами на нижнем ободе требовался основной катализ для ускорения протекания реакции, в случае же амина **8**, независимо от времени и условий реакции, была получена трудно разделяемая смесь продуктов частичного гуанидирования. Гидролиз соединений **18-21** соляной кислотой в водном тетрагидрофуране позволил получить соответствующие соли **23-26**, причем тиакаликс[4]арен **25** оказался водорастворимым.

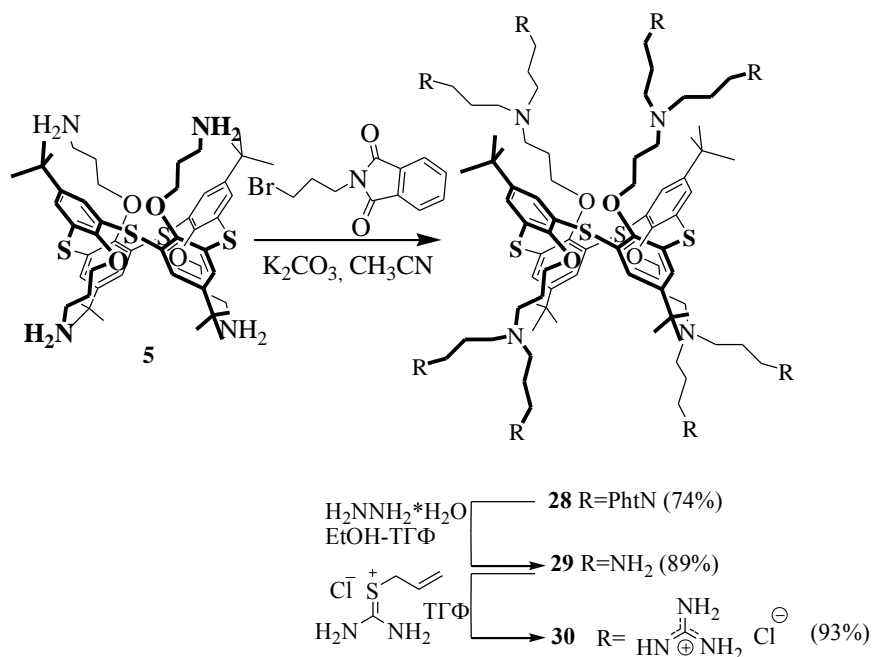
Известно, что водорастворимые катионные производные каликс[4]арена могут эффективно связываться с отрицательно заряженной поверхностью различных биомолекул, например ДНК, посредством электростатического взаимодействия и водородных связей, а также участвовать в процессах переноса ДНК через фосфолипидные мембраны клеток. Для оценки влияния водородных связей на эффективность взаимодействия рецептора **25** с полианионными субстратами нами был синтезирован модельный водорастворимый рецептор **27**, содержащий в своем составе четвертичные аммонийные группы, также способный электростатически взаимодействовать с полианионной поверхностью биомолекул, однако не содержащий в своем составе N-H связей.



Интересно отметить, что время гидролиза *трет*-бутоксикарбонильных производных **18-21** также значительно отличается: в случае макроцикла **18**, содержащего свободные фенольные группы на нижнем ободе макроцикла, время завершения гидролиза было больше в несколько раз по сравнению с тетразамещенными производными тиакаликс[4]арена **19-21**. После проведения реакции в течение 24 часов в случае макроцикла **18** реакционная смесь содержала наряду с целевым соединением **23** продукт частичного гидролиза *трет*-

бутоксикарбонильных групп **22** в соотношении **23:22** = 45:55. Методом препаративной колоночной хроматографии удалось выделить промежуточный продукт гидролиза **22** и охарактеризовать его. Было выдвинуто предположение, что наличие свободных фенольных групп в структуре макроцикла приводит к образованию прочной водородной связи между фенольными гидроксилами нижнего обода макроцикла и защищенными гуанидиниевыми группами тиакаликсарена, что стабилизирует образующуюся структуру **22**. Данное предположение было подтверждено данными одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР.

Для повышения числа катионных фрагментов в макроцикле было изучено взаимодействие амина **5** в конфигурации *1,3-альтернат* с *N*-(3-бромпропил)фталимидом. Полученное в результате соединение **28**, содержащее восемь фталимидных фрагментов, превращалось в амин **29** действием гидразингидрата в смеси этанол-ТГФ и далее, действием *S*-аллилизотиомочевины в кипящем тетрагидрофуране, в целевую октагуанидиниевую соль **30**, растворимую в воде.



Структура и состав новых производных тиакаликс[4]арена **7-30** были доказаны методами ЯМР ^1H , ^{13}C , ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии (MALDI-TOF) и элементным анализом. Для установления пространственной структуры макроциклов **7-30** были использованы методы двумерной NOESY ^1H - ^1H ЯМР-спектроскопии.

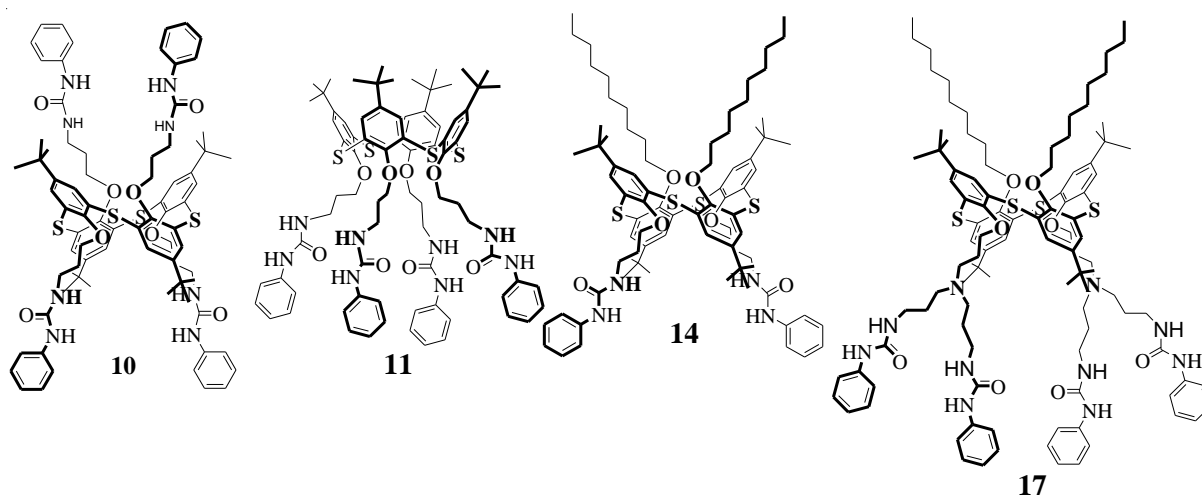
Таким образом, установлена стереоселективность алкилирования *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена *N*-(3-бромпропил)-фталимидом в ацетонитриле в присутствии карбоната натрия. Показано влияние макроциклической платформы *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена на реакционную способность амино- и *N,N'*-ди-(трет-бутоксикарбонил)гуанидиниевых групп.

2 Комплексообразующие и агрегационные свойства синтезированных макроциклов

С целью изучения влияния ряда структурных факторов (конформации макроцикла, числа и природы заместителей) на комплексообразующие свойства замещенных по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов по отношению к анионным и полианионным субстратам была проведена оценка рецепторной способности синтезированных соединений **11**, **14**, **17** по отношению к солям тетрабутиламмония *n*-Bu₄NX (X = F⁻, Cl⁻, Br⁻, CH₃CO₂⁻, H₂PO₄⁻, NO₃⁻) в трихлорметане, а водорастворимых макроциклов **25**, **27**, **29**, **30** - по отношению к различным полианионным субстратам (олигонуклеотиду GCGTTAACGC, ДНК из молок лосося и тимуса телёнка) методами электронной и флуоресцентной спектроскопии, а также методом динамического светорассеяния. В связи с низкой растворимостью соединения **10** его комплексообразующие свойства изучены не были.

Предварительно для оценки возможности связывания тетрабутиламмонийного катиона синтезированными тиакаликс[4]аренами растворы соединений **11**, **14**, **17** в присутствии 10-кратного избытка *n*-Bu₄NX (X = F⁻, Cl⁻, Br⁻, CH₃CO₂⁻, H₂PO₄⁻, NO₃⁻) в CDCl₃ были изучены с помощью спектроскопии ЯМР ¹H. В спектрах ЯМР ¹H хим.сдвиги протонов *n*-Bu₄N⁺ не меняются, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия полученных тиакаликс[4]аренов с тетрабутиламмонийным катионом.

Для количественной оценки комплексообразующей способности соединений **11**, **14**, **17** по отношению к ряду однозарядных анионов (F⁻, Cl⁻, Br⁻, CH₃CO₂⁻, H₂PO₄⁻, NO₃⁻) были определены величины констант устойчивости и стехиометрия образующихся комплексов. Методом изомолярных серий было установлено, что стехиометрия всех комплексов составляет 1:1. Методом спектрофотометрического титрования были оценены константы ассоциации образующихся комплексов (рис.2). Расчет констант устойчивости комплексов проводили методом Бенеши-Хильдебранта (табл.1).



Из приведенных данных (табл.1) хорошо видно, что тиакаликсарен **11** с четырьмя фенолмочевинными фрагментами в конформации *конус* связывает ряд анионов (F⁻, H₂PO₄⁻, CH₃COO⁻) с близкой эффективностью.

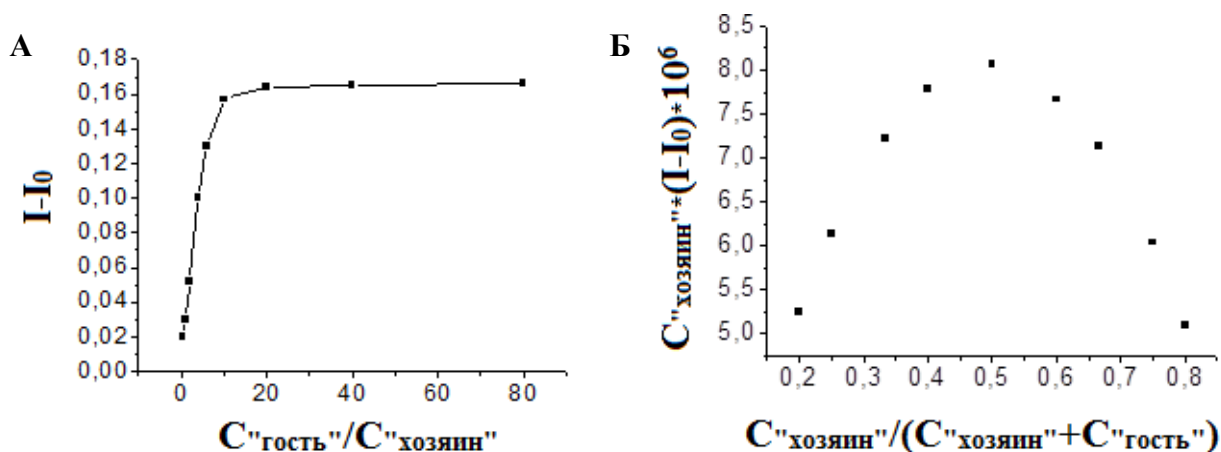


Рис.2. (А) Кривая титрования и (Б) график Джоба для системы **11** с $n\text{-Bu}_4\text{NF}$.

Таблица 1. Логарифмы констант ассоциации ($\lg K_{\text{асс}}$) комплексов синтезированных соединений с анионами.

Соединение	Анион					
	F^-	Cl^-	Br^-	H_2PO_4^-	CH_3COO^-	NO_3^-
11	4.83 ± 0.25	3.41 ± 0.17	-	4.01 ± 0.51	4.44 ± 0.45	-
14	3.26 ± 0.09	3.16 ± 0.30	-	3.44 ± 0.31	4.18 ± 0.40	-
17	4.12 ± 0.20	-	-	4.91 ± 0.14	4.20 ± 0.24	3.95 ± 0.58

- нет изменений в УФ спектрах

В случае макроцикла **14** максимальное значение логарифма константы ассоциации комплекса наблюдается при связывании ацетат-аниона, а для соединения **17** – дигидрофосфат-аниона. При переходе от производного нулевой генерации (макроцикл **14**) к первой (соединение **17**) увеличивается число рецепторных фрагментов и, как следствие, в целом наблюдается повышение эффективности рецептора. Однако при этом происходит изменение в ряду связываемых «гостей»: тиакаликсарен **14** не связывает $n\text{-Bu}_4\text{NBr}$ и $n\text{-Bu}_4\text{NNO}_3$, а «хозяин» **17** – $n\text{-Bu}_4\text{NCl}$ и $n\text{-Bu}_4\text{NBr}$. Наличие в соединениях **11** и **17** одинакового числа участков связывания позволило оценить влияние третичных атомов азота (соединение **17**) на комплексообразующие свойства тиакаликсарена: наличие данных фрагментов в структуре рецептора повышает его селективность по отношению к дигидрофосфат-аниону. Также следует отметить, что макроцикл **17** образует весьма прочный комплекс со слабо координирующимся нитрат-анионом. Видимо, рецепторные фрагменты макроцикла **17** обладают достаточной гибкостью для образования комплементарной для данного аниона псевдополости.

Взаимодействие между водорастворимыми рецепторами **25**, **27**, **30**, **31** и модельными биомакромолекулами первоначально было изучено методом УФ спектроскопии (рис.3). В качестве объектов исследования мы остановили свой выбор на двухцепочечном олигонуклеотиде (GCGTTAACGC), ДНК из молок лосося и тимуса телёнка. Выбор объектов исследования обусловлен возможностью получения структурных характеристик образующихся ассоциатов в случае олигонуклеотида, а также доступностью и различием в размерах и форме в случае природных ДНК из тимуса телёнка и молок лосося.

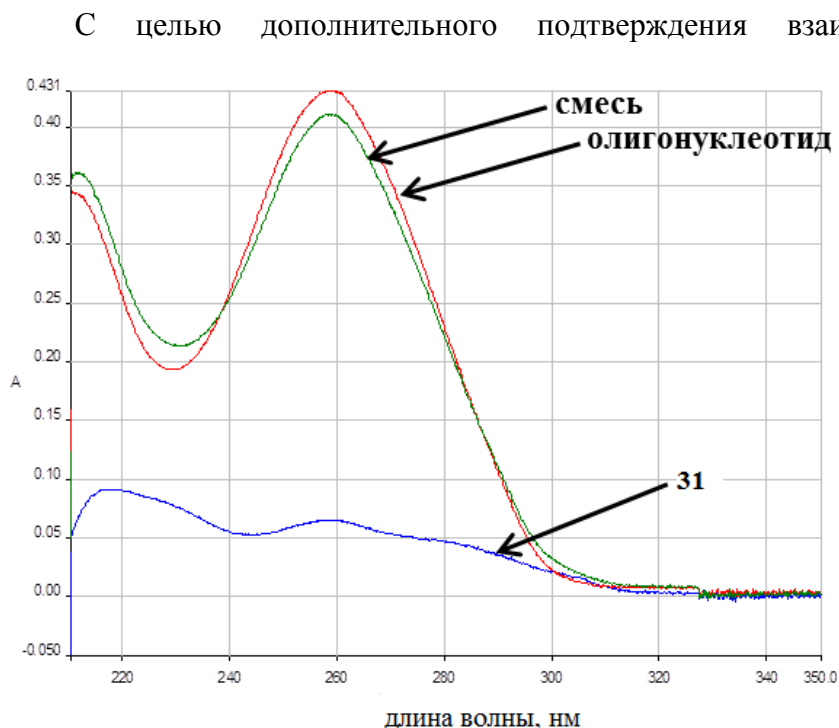
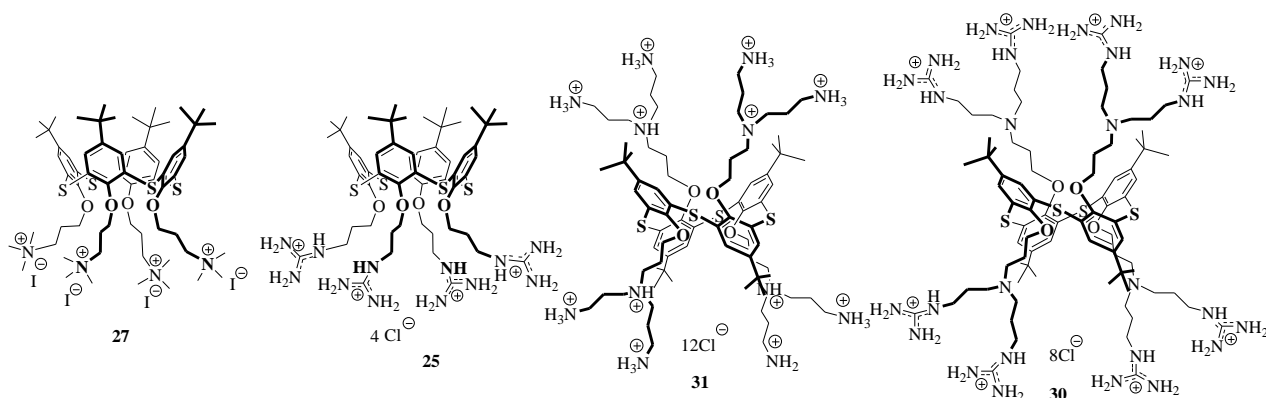


Рис.3. Спектры поглощения синтетического олигонуклеотида ($4 \cdot 10^{-6}$ M), рецептора **31** ($3 \cdot 10^{-6}$) и их смеси в 5 mM буфере Tris-HCl.

С целью дополнительного подтверждения взаимодействия синтезированных тиакаликсаренов **25**, **27**, **30**, **31** с синтетическим олигонуклеотидом и нуклеиновыми кислотами нами было проведено исследование методом флуоресцентной спектроскопии. Известно, что этот метод обладает высокой чувствительностью и широко используется для изучения ассоциации биологических макромолекул с рецепторами.

Поскольку ни ДНК, ни изучаемые тиакаликсарены заметной флуоресценцией не

обладают, в качестве флуоресцентной метки нами был выбран этидийбромид (ЭБ). Хорошо известно, что флуоресценция свободного этидийбромида незначительна из-за тушения. При связывании же с ДНК (встраивании в малую бороздку) этидийбромид экранируется от влияния кислорода и растворителя, его эмиссия значительно возрастает.

Далее было изучено влияние тиакаликсаренов **25**, **27**, **30**, **31** на спектры флуоресценции комплекса ДНК из молок лосося с этидийбромидом. В качестве примера приведены спектры люминесценции комплекса ДНК лосося с этидийбромидом в присутствии различных количеств гуанидинийсодержащего рецептора **25** (рис.4). При добавлении рецептора **25** к раствору комплекса ДНК/ЭБ смещения максимумов испускания практически не наблюдается, однако наблюдается уменьшение интенсивности люминесценции с ростом концентрации макроцикла **25** (рис.6). При этом следует отметить, что наибольшие изменения наблюдаются при достаточно низких концентрациях каликсарена (~ 50 - 100 мкМ), при

увеличении же концентрации рецептора более 110 мкМ значение эмиссии достигает своего

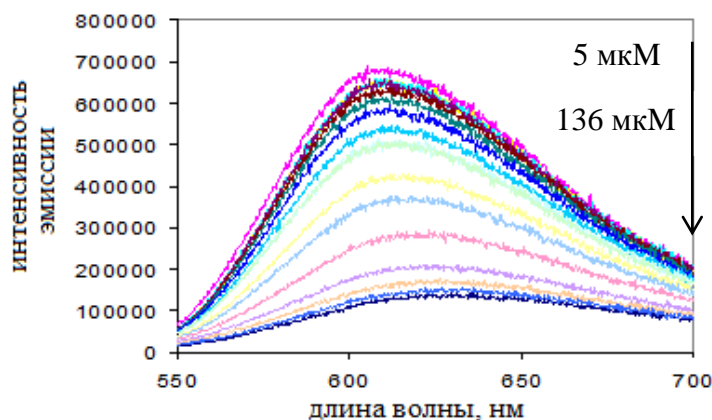


Рис.4. Спектры эмиссии ассоциата ДНК из молока лосося (0.11 мг/мл) с ЭБ (20 мкМ) в 5 мМ буфере Tris-HCl (pH 7.5) в присутствии тиакаликсарена **25** (5-136 мкМ).

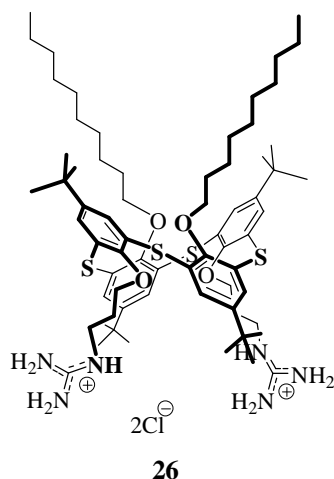
минимума и более не изменяется.

Очевидно, что связывание катионного рецептора **25** с полианионной ДНК препятствует интеркаляции этидийбромида в биомакромолекулы. Особо следует отметить тот факт, что взаимодействие изученных ДНК с тиакаликсареном **25** наблюдается уже при его низких концентрациях ($5 \cdot 10^{-6}$ М). В случае модельного соединения **27**, содержащего тетраалкиламмонийные группы на нижнем ободе макроцикла, выявлено значительно меньшее

сродство ко всем полианионным субстратам, по сравнению с соединением **25**, проявляющееся в отсутствии изменений в спектрах флуоресценции комплекса ДНК с этидийбромидом, что свидетельствует о существенном вкладе водородных связей в эффективность взаимодействия рецептора с полианионным субстратом.

Далее с целью изучения размеров образующихся ассоциатов биомакромолекул с рецепторами **25**, **30**, **31** был применен метод динамического светорассеяния. Как известно, для осуществления трансфекции важно не только наличие взаимодействия биополимера с рецептором, но и размер образующегося агрегата. Таким образом, нам необходимо было установить не только сам факт агрегации, но и размеры получающихся комплексов с целью оценки потенциальной способности к трансфекции. Оказалось, что в случае макроциклов **25** и **31** размер ассоциатов с ДНК из молока лосося составил 83 и 190 нм соответственно, что является приемлемым для трансфекционных экспериментов.

3 Наночастицы на основе гуанидинийсодержащего производного тиакаликс[4]арена



Значительный интерес представляло получение наночастиц на основе нерастворимого в воде макроцикла **26**, содержащего в своей структуре гидрофобные децильные группы и гидрофильные гуанидиниевые фрагменты, пространственно разделенные по обе стороны макроцикла. Для получения частиц решено было использовать метод нанопреципитации, позволяющий легко получать монодисперсные липидные наночастицы. Размер полученных наночастиц был определен методом динамического светорассеяния и составил 145 нм, индекс полидисперсности -

0.11, что соответствует монодисперсной системе. *Дзета*-потенциал наночастиц на основе макроцикла **26**, определяющий эффективность их взаимодействия с полианионными субстратами, был определен измерением электрофоретической подвижности частиц (+60 мВ).

Сродство полученных липидных наночастиц к полианионным биомакромолекулам

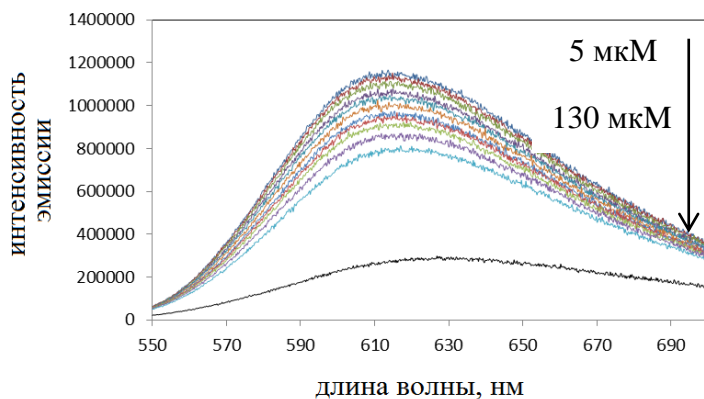


Рис.5. Влияние липидных наночастиц на основе соединения **26** (5-130 мкМ) на флуоресценцию комплекса ДНК из молока лосося ($5 \cdot 10^{-7}$ М) с этидийбромидом (0.5 мкМ).

было изучено на примере ДНК из молока лосося методом флуоресцентной спектроскопии. Было показано, что липидные наночастицы на основе соединения **26** эффективно взаимодействуют с поверхностью биополимера, ингибируя интеркаляцию этидий бромида (рис.5).

Следует отметить, что уменьшение интенсивности флуоресценции интеркалятора наблюдалось независимо от очередности добавления липидных

наночастиц и этидийбромида.

В связи с этим было выдвинуто предположение, что высокий поверхностный положительный заряд частиц приводит к эффективному взаимодействию с молекулой ДНК,

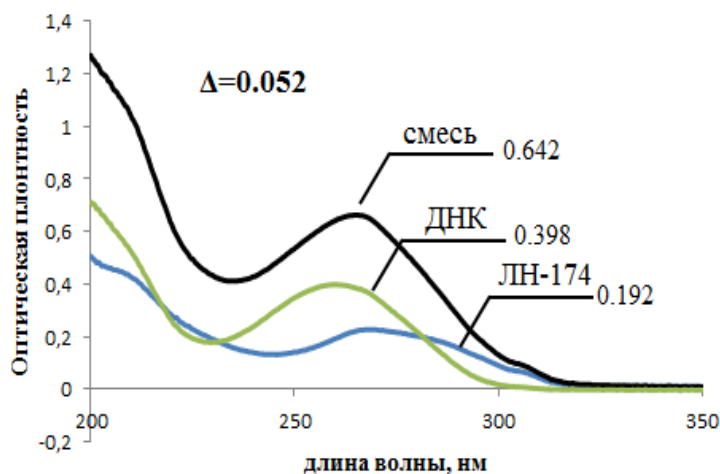


Рис.6. Спектры поглощения ДНК из молока лосося ($4 \cdot 10^{-6}$ М), липидных наночастиц ($4.6 \cdot 10^{-6}$ М) и их смеси.

вызывающему денатурацию (разрыв водородных связей и стэкинг-взаимодействий, что приводит к расплетанию и разделению цепей) ДНК. В связи с этим для выяснения механизма взаимодействия полученных липидных наночастиц с модельным олигонуклеотидом решено было использовать метод электронной спектроскопии. Оказалось, что прибавление липидных наночастиц к раствору ДНК в буфере приводит к гиперхромному эффекту ($\lambda = 260$ нм) (рис.6), что является критерием

нарушения стэкинга оснований ДНК при разделении двух полинуклеотидных цепей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие основные выводы:

1. Осуществлен постадийный синтез 24 новых, ранее не доступных, замещенных по нижнему ободу *n*-трет-бутилтиакаликс[4]аренов, содержащих фталимидные, аминные, фенилмочевинные, аммонийные и гуанидиниевые фрагменты, в конформациях *конус* и *1,3-альтернат*, структура которых установлена комплексом физических методов (одномерной ЯМР ^1H , ^{13}C и двумерной ^1H - ^1H NOESY спектроскопией, ИК-спектроскопией, масс-спектрометрией).
2. Исследованы стереохимические закономерности протекания реакции *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена с *N*-(3-бромпропил)фталимидом в ацетонитриле. Установлено, что стереоселективность взаимодействия контролируется природой «темплатного» катиона соответствующего карбоната щелочного металла: в случае карбоната натрия образуется тетразамещенное производное в конформации *конус*, а в случае карбонатов калия и цезия – *1,3-альтернат*.
3. Показано влияние макроциклической платформы *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена на реакционную способность amino- и *N,N'*-ди-(трет-бутоксикарбонил)гуанидиниевых групп:
 - пространственная сближенность *n*-трет-бутильных и аминогрупп в тетразамещенных производных в конфигурации *1,3-альтернат*, а также вовлечение аминогрупп во внутримолекулярную цепь водородных связей в случае частично замещенных производных приводит к понижению их реакционной способности;
 - методами одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР выявлено, что свободные фенольные группы способны координировать *N,N'*-ди-(трет-бутоксикарбонил)гуанидиниевый фрагмент в положении, затрудняющем гидролиз защитных групп.
4. Предложены новые синтетические рецепторы на основе *n*-трет-бутилтиакаликс[4]арена, содержащие фенилмочевинные фрагменты на нижнем ободу макроцикла, способные эффективно связывать фторид-, ацетат-, дигидрофосфат- и нитрат-ионы. Установлено, что введение третичных атомов азота в структуру рецептора, находящегося в конфигурации *1,3-альтернат*, повышает его селективность по отношению к дигидрофосфат-аниону.
5. Методами электронной и флуоресцентной спектроскопии показано сродство синтезированных катионных производных по отношению к модельным биомакромолекулам: олигонуклеотиду (GCGTTAACGC), низкомолекулярной и высокомолекулярной ДНК. Размер ассоциатов в случае некоторых полученных производных, определенный методом динамического светорассеяния, оказался в пределах, оптимальных для трансфекции (200 нм).
6. Впервые получены однокомпонентные монодисперсные липидные наночастицы на основе производного тиакаликс[4]арена, содержащие гуанидиниевые группы на поверхности. Методом измерения электрофоретической подвижности частиц показан их высокий *дзета*-потенциал (+60 мВ). Методами электронной и флуоресцентной

спектроскопии установлено эффективное взаимодействие полученных наночастиц с модельным полинуклеотидом (ДНК из молок лосося), приводящее к денатурации (разрушение водородных связей между комплементарными основаниями) ДНК.

Основное содержание работы отражено в следующих публикациях

1. Fayzullin, D. Influence of nature of functional groups on interaction of tetrasubstituted at lower rim p-tert-butyl thiacalix[4]arenes in 1,3-alternate configuration with model lipid membranes / D. Fayzullin, N. Vylegzhanina, O. Gnezdilov, V. Salnikov, A. Galukhin, I. Stoikov, I. Antipin, Y. Zuev // *Applied Magnetic Resonance*. – 2011. – V. 40, N. 2. – P.231–243.
2. Мостовая, О.А. Супрамолекулярный рецептор на основе олигоаммонийного производного п-трет-бутилтиакаликс[4]арена: взаимодействие с нуклеиновыми кислотами / О.А. Мостовая, А.В. Галухин, И.С. Антипин, А.И. Коновалов, И.И. Стойков // *Бутлеровские сообщения*. – 2011. – Т.28, №18. – С.57-62.
3. Galukhin, A. Mono-, 1,3-Di- and tetrasubstituted p-tert-butylthiacalix[4]arenes containing phthalimide groups: Synthesis and functionalization with ester, amide, hydrazide and amino groups / A. Galukhin, E. Zaikov, I. Antipin, A. Konovalov, I. Stoikov // *Macroheterocycles* – 2012. – V.5, N.3. – P.266-274.
4. Galukhin, A.V. Phenylurea-equipped p-tert-butylthiacalix[4]arenes as the synthetic receptors for monocharged anions / A.V. Galukhin, K.V. Shabalin, I.S. Antipin, A.I. Konovalov, I.I. Stoikov // *Mendeleev Commun.* – 2013. – V. 23, N.1. – P.41-43.
5. Галухин, А.В. Синтез гиперразветвленных структур на основе тиакаликс[4]арена и их комплексообразование с биомакромолекулами / А.В. Галухин, О.А. Мостовая, И.С. Антипин, А.И. Коновалов, И.И. Стойков // *Тезисы докладов XIX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии*. - Волгоград, 2011. – С.237.
6. Галухин, А.В. Синтез и распознавание анионных субстратов производными тиакаликс[4]арена, содержащими фенилмочевинные фрагменты / А.В. Галухин, К.В. Шабалин, И.С. Антипин, И.И. Стойков // *Сборник тезисов Всероссийской конференции «Органический синтез: химия и технология»*. – Екатеринбург, 2012. – С.У10.
7. Galukhin, A.V. Synthesis and complexation abilities of hyperbranched structures based on thiacalix[4]arene: towards biomacromolecules / A.V. Galukhin, O.A. Mostovaya, I.S. Antipin, A.I. Konovalov, I.I. Stoikov // *Book of Abstracts International Congress on Organic Chemistry*. – Kazan, 2011. – P.274.
8. Галухин, А.В. Разработка подходов к синтезу гиперразветвленных структур на основе тиакаликсарена / А.В. Галухин, К.В. Шабалин, И.И. Стойков // *Тезисы докладов итоговой научно-образовательной конференции студентов Казанского (Приволжского) федерального университета*. - Казань, 2011. – С.67.
9. Галухин, А.В. Дизайн гиперразветвленных структур на основе тиакаликс[4]арена / А.В. Галухин, К.В. Шабалин, И.И. Стойков, И.С. Антипин // *Тезисы докладов X Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра*

Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века». - Казань, 2011. - С.31.

10. Мостовая, О.А. Взаимодействие олигокатионных производных п-трет-бутилтиакаликс[4]арена с биополимерами [Текст] / О.А. Мостовая, Д.В. Попова, Д.Б. Пуплампу, А.В. Галухин, Ю.Ф. Зуев, И.С. Антипин, А.И. Коновалов, И.И. Стойков // Сборник тезисов XIV Молодежной научной школы-конференции по органической химии. - Екатеринбург, 2011. - С.177.

11. Стойков, И.И. Синтез гиперразветвленных структур на основе тиакаликс[4]аренов [Текст] / И.И. Стойков, А.В. Галухин, И.С. Антипин, А.И. Коновалов // Book of Abstract of International Symposium on Advanced Science in Organic Chemistry (ASOC CRIMEA10). - Miskhor, Crimea, 2010. – P.У-44.

12. Мостовая, О.А. Взаимодействие полиаминного производного тиакаликс[4]арена с ДНК [Текст] / О.А. Мостовая, Д.В. Попова, А.В. Галухин, И.И. Стойков, И.С. Антипин, А.И. Коновалов // Book of Abstract of International Symposium on Advanced Science in Organic Chemistry (ASOC CRIMEA10). - Miskhor, Crimea, 2010. – С.151.

13. Галухин, А.В. Разработка подходов к синтезу гиперразветвленных структур на основе тиакаликс[4]арена [Текст] / А.В. Галухин, К.В. Шабалин, И.И. Стойков, И.С. Антипин // Тезисы докладов Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Актуальные проблемы органической химии». - Казань, 2010. - С.17.

14. Шабалин, К.В. Синтез и комплексообразующие свойства новых производных тиакаликс[4]арена, содержащих фенилмочевинные фрагменты [Текст] / К.В. Шабалин, А.В. Галухин, И.И. Стойков // Тезисы докладов XI Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века». - Казань, 2012. - С.79.

15. Галухин, А.В. Синтез, распознавание анионных субстратов и агрегационные свойства производных тиакаликс[4]арена, содержащих фенилмочевинные фрагменты [Текст] / А.В. Галухин, К.В. Шабалин, И.И. Стойков, И.С. Антипин // Тезисы докладов XV Молодежной школы-конференции по органической химии. - Уфа, 2012. - С.115.